

## Effect of Hydroxyapatite to Load Failure Value in Rat with Diaphyseal Femur Fracture

Rinartha AS , Rahyussalim

Department of Orthopaedic and Traumatology  
Faculty of Medicine Universitas Indonesia/Cipto Mangunkusumo General Hospital  
Jakarta, Indonesia

### ABSTRACT

**Introduction.** Calcium hydroxyapatite are non organic compound of the bone formed the fracture healing. In fracture healing, the parts of the compounds make up unordinary scaffold and producing an incredible amount of mesenchymal stem cell under bearing of the scaffold. This study is aimed to determine the effect of hydroxyapatite administration to load failure value in mice with diaphyseal femur fracture.

**Materials and methods.** Research was done using Sprague Dawley rat undergone fracturization of femoral bone and insertion of internal fixation with application of ossein hidroxyapatite compound or aquadest as placebo. Both groups are treated under same condition and on the 8th week were harvested and put into special jig and was loaded with mechanical compression. The load failure value were noted and analyzed.

**Results.** The p value is 0,000 which means there is a significant difference among two groups, with the lowest point of load failure value is in the placebo group and the highest is in hydroxyapatite group.

**Conclusion.** Ossein hydroxyapatite compound application results in higher load failure value than placebo in rat with diaphyseal femur fracture.

**Keywords:** ossein hidroxyapatite compound, aquadest, compression force, fracture healing

Corresponding author :

Adi Surya Rinartha

Department of Orthopaedic and Traumatology

Universitas Indonesia/Cipto Mangunkusumo General Hospital

Jalan Diponegoro No. 71 Jakarta 10430

Telp/Fax: +62 21 3905984

Email: adisuryarinartha@yahoo.com

## Pengaruh *Hydroxyapatite* terhadap Nilai *Load Failure* pada Tikus dengan Fraktur Diafisis Femur

### ABSTRAK

**Latar Belakang.** *Hydroxyapatite* merupakan senyawa pembentukan tulang yang berperan sebagai ko-faktor mineralisasi kalsium yang merupakan bagian pokok proses pembentukan tulang. Kemampuannya sebagai osteokonduksi dan tidak adanya sifat antigenitas menyebabkan osteointegritas terjadi lebih cepat terutama pada lokasi yang memiliki vaskularisasi baik. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian *hydroxyapatite* terhadap nilai *load failure* pada tikus dengan fraktur diafisis femur.

**Bahan dan cara kerja.** Penelitian merupakan uji eksperimental dengan menggunakan tikus Sprague Dawley. Dilakukan frakturisasi pada tulang femur dan pemasangan fiksasi interna pada tikus. Tikus dialokasikan ke dalam dua kelompok untuk menerima *ossein hidroxyapatite compound* atau *aquadest* sebagai plasebo. Kedua kelompok hewan coba diperlakukan sama. Setelah 8 minggu, dilakukan ekstraksi tulang femur dan pemasangan *jig* khusus untuk kompresi. Nilai *load failure* dari tiap tulang femur kedua kelompok diukur dengan mesin kompresi. Analisis statistik dengan uji *t-test* dilakukan untuk menilai perbedaan antara kedua kelompok.

**Hasil.** Nilai *load value* di antara kedua kelompok ditemukan berbeda secara bermakna ( $p=0,000$ ). Setelah dilakukan analisis *Post Hoc*, diperoleh hasil  $p=0,000$  pada perbandingan semua kelompok.

**Simpulan.** Pemberian *ossein hidroxyapatite compound* pada tikus dengan fraktur diafisis femur dapat meningkatkan nilai *load failure*.

**Kata kunci:** *ossein hidroxyapatite compound*, *aquadest*, tekanan kompresi, penyembuhan fraktur

### Pendahuluan

Komposisi biokimia tulang terdiri dari substansi organik sekitar 30%, substansi inorganik sekitar 60% dan air sekitar 10%. Komponen organik tulang termasuk sel tulang, serat kolagen, dan protein yang merupakan bagian dari matriks tulang. Komponen inorganik tulang meliputi kalsium dan fosfat dimana pada tulang saling berikatan dalam bentuk *hydroxyapatite*. *Hydroxyapatite* merupakan senyawa utama dalam pembentukan dan mineralisasi tulang, yang berperan sebagai ko-faktor mineralisasi kalsium.<sup>1-3</sup>

Mineral sintetis pengganti tulang yang terdiri dari *hydroxyapatite* dan *tricalcium phosphate* telah digunakan secara luas selama bertahun-tahun untuk mengatasi masalah defek tulang. Kemampuannya sebagai osteokonduksi dan tidak adanya sifat antigenitas menyebabkan osteointegritas terjadi lebih cepat terutama pada lokasi yang memiliki vaskularisasi baik dan steril. *Hydroxyapatite* memiliki struktur kristal yang sama dengan mineral tulang dan telah diteliti sebagai bahan pengganti tulang selama 30 tahun.<sup>4</sup>

Saat ini, terjadi peningkatan kebutuhan terhadap biomaterial sintetis baru untuk menggantikan jaringan tulang. *Hydroxyapatite* yang berukuran nanostruktur memiliki efektivitas yang lebih baik dibandingkan dengan *hydroxyapatite* yang berukuran mikrostruktur.<sup>5</sup> Ukuran

kristal rata-rata kurang dari 100 nm akan meningkatkan kecepatan absorpsi kristal oleh makrofag dan osteoklas, serta menginduksi diferensiasi sel osteoprogenitor menjadi osteoblas. Respons tersebut bertanggung jawab terhadap produksi mineral sehingga sangat penting untuk proses osteointegrasi. Selain itu, kristal tersebut juga memiliki kemampuan biokompatibilitas untuk merangsang vaskularisasi.<sup>5,6</sup>

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pengujian *nanocrystalline hydroxyapatite* terhadap berbagai panjang defek tulang femur tikus putih jenis Sprague Dawley. Dari penelitian tersebut disimpulkan bahwa *nanocrystalline hydroxyapatite* secara bermakna meningkatkan proses penyembuhan fraktur.

Kekuatan kalus yang terbentuk pada fraktur tulang panjang setelah pemberian *hydroxyapatite* saat ini belum diketahui. Penelitian ini ingin mengetahui kekuatan kalus yang terbentuk setelah pemberian *hydroxyapatite* pada fraktur tulang diafisis femur tikus putih.

### Bahan dan Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *posttest control* pada 36 ekor tikus jantan. Kriteria inklusi penelitian adalah tikus jantan jenis Sprague Dawley berusia minimal 4 bulan dengan berat minimal 250 gram dan maksimal 350 gram, serta kondisi kesehatan yang baik pada akhir minggu

ke-4. Kriteria eksklusi penelitian adalah tikus dengan berat kurang dari 250 gram atau dalam kondisi kesehatan yang tidak baik pada akhir minggu ke-8, atau tikus yang setelah dilakukan refrakturisasi mengalami paralisis.

Semua tikus diberikan asupan yang sama dan ditempatkan di kandang terpisah dengan suhu ruangan antara 25<sup>o</sup>-27<sup>o</sup>C di Laboratorium Hewan Gizi FKUI. Setelah dibius dengan injeksi ketamin 40 mg/kg dan diazepam 5 mg/kg intraperitoneal, fraktur dilakukan dengan osteotomi dan difiksasi dengan *K-wire* 1,4 mm secara intra-meduler. Diberikan antibiotik ampicilin 100 mg/kg dan parasetamol 100 mg/kg per oral selama 5 hari pertama. Tikus dikelompokkan secara acak menjadi dua kelompok. Salah satu kelompok menerima *hydroxyapatite* selama 8 minggu dalam bentuk pasta (*Ostim*<sup>®</sup>) yang diberikan sampai menutupi seluruh fraktur. Masing-masing kelompok tikus dievaluasi dengan melakukan tes axial dengan mesin tes axial *Schenk*<sup>®</sup> dengan profil tekanan minimal 10 N di Puspitek Bogor dengan menggunakan *jig* khusus setelah minggu ke-8. Mesin ini kemudian memberikan hasil output berupa nilai *load failure* dari setiap femur tikus yang digambarkan dengan grafik. Data *load failure* antar kelompok dianalisis dengan *t-test*.

### Hasil Penelitian

Pengujian kompresi tikus yang berasal dari dua kelompok dengan perlakuan yang berbeda menunjukkan nilai *load failure* tertinggi terdapat pada kelompok *hydroxyapatite* dengan nilai 101 N, sedangkan nilai *load failure* terendah terdapat pada kelompok kontrol dengan nilai 74 N. (tabel 1) Nilai rerata tertinggi ditemukan pada kelompok *hydroxyapatite* sedangkan nilai rerata terendah pada kelompok kontrol. Terdapat perbedaan yang bermakna nilai *load failure* antara kedua kelompok ( $p=0,000$ ).

### Diskusi

Perlakuan frakturisasi secara terbuka dengan melakukan insisi dan osteotomi sehingga didapatkan keadaan yang menyerupai fraktur terbuka, yaitu adanya kerusakan jaringan lunak, periosteum yang rusak dan adanya paparan tulang walaupun tanpa disertai pemberian kontaminasi pada luka. Hal ini dilakukan untuk menghindari adanya pengaruh infeksi terhadap penyembuhan yang dapat mengaburkan tujuan penelitian ini. Perlakuan produksi fraktur dengan cara terbuka ini disebutkan mempunyai pengaruh yang berbeda dengan frakturisasi secara tertutup.<sup>25</sup>

Kemudian pada minggu ke-8 dilakukan tes axial pada tulang femur yang sudah dilakukan pemasangan *jig* khusus dengan mesin *Schenk* yang memiliki nilai minimal tekanan tes axial sebesar sepuluh newton dan dilakukan

**Tabel 1. Hasil Tes pengujian kompresi load failure**

No	Kelompok Kontrol	Kelompok Hidroxyapatite
1	80	101
2	76	100
3	78	96
4	81	95
5	77	99
6	76	98
7	88	98
8	80	97
9	77	96
10	76	95
11	78	96
12	78	97
13	77	96
14	70	101
15	79	100
16	80	96
17	79	97
18	80	99
Rerata	77,83±2,75	97,61±2,25

pencatatan nilai masing-masing *load failure* tes axial dari masing-masing kelompok.

Pertimbangan penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih jenis Sprague – Dawley karena merupakan hewan coba yang mudah didapat dan ditenakkan tanpa terjadi diferensiasi sifat sehingga didapatkan subyek yang homogen. Jenis tersebut secara anatomis lebih mudah dilakukan operasi dan merupakan model yang paling sering dipakai. Proses penyembuhan tulang lebih cepat dan dapat dilihat perkembangan proses penyembuhannya.<sup>24</sup> Dengan internal fiksasi berupa *intramedullary nailing* menggunakan *Kirschner wire* sudah cukup adekuat untuk imobilisasi fraktur sehingga diharapkan proses penyembuhan fraktur yang wajar meskipun dengan aktivitas tikus seperti biasanya.

Semua sampel hewan coba adalah tikus putih dengan jenis kelamin jantan. Hal ini dilakukan untuk menghindari adanya pengaruh hormonal pada hewan coba. Semua hewan coba yang diambil sebagai sampel berusia empat bulan, yang didapatkan dengan mengambil sampel hewan coba dari indukan yang sama. Dipilih setelah usia empat bulan karena setelah usia tersebut tulang sudah dinilai dewasa dan relatif homogen.

Pada penelitian ini, semua faktor yang dapat mempengaruhi proses penyembuhan tulang seperti faktor mekanis dan faktor biologi, dibuat homogen untuk kedua kelompok, sehingga perannya dalam menentukan perbedaan pada *load failure compression* dapat diabaikan. Satu-satunya hal yang menentukan adalah pemberian *hydroxyapatite*. *Hydroxyapatite* bersifat osteokonduktif berperan sebagai *scaffold* untuk regenerasi tulang.<sup>23</sup> *Hydroxyapatite* diberikan dalam sediaan pasta (Ostim®) yang berukuran nanopartikel. Sel-sel tulang secara alami mudah beradaptasi dengan materi berukuran nanopartikel.<sup>25</sup> Pada kelompok hewan coba dengan pemberian *hydroxyapatite*, kalus yang terbentuk secara klinis lebih besar, vaskularisasi dan proses osteogenesis untuk pembentukan tulang baru lebih nyata.<sup>11,12</sup>

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa pemberian *hydroxyapatite* pada lokasi fraktur dapat meningkatkan nilai *load failure* terhadap kalus yang terbentuk. Dengan demikian, pemberian *hydroxyapatite* dapat dipertimbangkan untuk mempercepat proses osteogenesis dan pada akhirnya dapat mempersingkat waktu rehabilitasi dengan kekuatan kalus yang lebih baik.

## Simpulan

Pemberian *hydroxyapatite* pada tikus dengan fraktur diafisis femur dapat meningkatkan nilai *load failure*.

## Referensi

- Salter RB. Textbook of disorders and injuries of the musculoskeletal system. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.
- Wood GW. General principles of fracture treatment. In: Campbell's operative orthopaedics. 10th ed. Philadelphia: Mosby; 2003.
- Brinker MR, O'Connor DP. Basic sciences in review of orthopaedics. 4th ed. New York: Saunders; 2004.
- Huber FX, Belyaev O, Hillmeier J, Kock HJ, Huber C, Meeder PJ, et al. First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM® in human cancellous bone. BMC Musculos Disorders 2006;7:50.
- Nair LS, Laurencin CT. Nanofibers and nanoparticles for orthopaedics surgery applications. J Bone Jont Surg Am. 2008;90 Suppl 1:128-31.
- Pezzattini S, Morbidella L, Solito R, Pacagnini E, Boanini E, Bigi A, et al. Nanostructured HA crystal up-regulate FGF2 expression and activity in microvascular endothelium promoting angiogenesis. Bone. 2007;41:523-34.
- Lieberman JR, Aaron Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am. 2002;84:1032-44.
- Solomon L, Warwick D, Nayagam S. Apley's system of orthopaedics and fractures 8<sup>th</sup>ed. New York: Oxford University Press Inc; 2001.
- Finkemeier CG. Current concept review, bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am. 2002;84(3):454-64.
- Aronson J, Cornell CN. Bone healing and grafting. In: Beaty JH, ed. Orthopaedics knowledge update 6. Rosemont: American Academy of Orthopaedics Surgeon; 1999.p.25-36.
- Toth JM, Lynch KL, Hackbarth DA. Ceramic-induced osteogenesis following subcutaneous implantation of calcium phosphates. Bioceramics. 1993;6:9-13.
- Klein CPAT, De Groot K, Chen W, Li Y, Zhang X. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. Biomaterials. 1994;15:31-4.
- Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. Plast Reconstr Surg. 2002;109(2):619-30.
- Kurashina K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H. Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. Biomaterials. 2002;23:407-12.
- Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. Biomaterials. 1996;17:31-5.
- Lord CF, Gebhardt MC, Tomford WW, Mankin HJ. Infection in bone allografts: incidence, nature and treatment. J Bone Joint Surg Am. 1988;70:369-67.
- Buckwalter A, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R, Bone Biology. Part I: structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. J Bone Joint Surg. Am. 1995;77:1256-75.
- Buckwalter A, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R, Bone Biology. Part II: formation, form, modeling, remodeling and regulation of cell function. J Bone Joint Surg Am. 1995;77:1276-89.
- Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Europs Cells and Mat. 2008;15:53-76.
- Bucholtz RW, Heckman JD. Rockwood and Green's fractures in adults. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins;2002.
- Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Aspect of current management: bone allograft, what they can offer and what they cannot. J Bone Joint Surg Br. 2007;89(5):574-9.
- Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. J Postgrad Med. 2002;48(2):142-8.
- Spivak JM, Di Cesare PE, Feldman DS, Koval KJ, Rokito AS, Zuckerman JD. Orthopaedics: a study guide implant biomechanics. USA: McGraw-Hill Companies Inc; 1999.
- Jee WSS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. J Musculoskel Neuron Interact. 2001;1(3):193-207.
- Nair LS, Laurencin CT. Nanofibers and nanoparticles for orthopaedic surgery applications. J Bone Jont Surg Am. 2008; 90 Suppl 1:128-31.